

FUS変異による筋萎縮性側索硬化症患者由来の人工多能性幹細胞を用いた軸索病態解明

著者	秋山 徹也
号	87
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3682号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00124074

氏 名	あきやま てつや 秋山 徹也
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 29 年 9 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	FUS 変異による筋萎縮性側索硬化症患者由来の人工多能性幹細胞 を用いた軸索病態解明
論 文 審 査 委 員	主査 教授 青木 正志 教授 大和田 祐二 教授 永富 良一

論 文 内 容 要 旨

【背景】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は系統的な運動ニューロン障害を特徴とし、発症から数年で死に至る難治性疾患である。ALSの約10%に家族性ALS (FALS) が存在し、1993年の*SOD1*の発見以降20以上の遺伝子が同定されている。FALS原因遺伝子の一つである*FUS*はRNA結合能を持つ蛋白をコードし、RNA代謝異常とALS病態の関連が指摘されている。*FUS*は通常核に局在するが、神経細胞では細胞質にも局在し、軸索輸送や局所翻訳に関わるとされる。ALSでは細胞死に先行する軸索変性の報告があり、*FUS*変異ALS症例の剖検脳では*FUS*陽性の細胞質異常凝集体が確認されている。そこで、*FUS*変異ALSでは、*FUS*のRNA結合蛋白としての機能異常により運動ニューロンの軸索輸送、局所翻訳が障害され細胞機能不全が生じると病態仮説をたてた。ALSを含む神経変性疾患では生体からの病変採取は困難で細胞株を用いた研究が主体だったが、人工多能性幹細胞 (iPSCs) の発見により患者由来神経の解析が可能となった。

【目的・方法】*FUS*変異がALSという表現型へ与える影響を明らかにし、*in vitro*での適切な細胞モデルを確立し、ALSの軸索病態における*FUS*変異の影響を解析するため、以下のステップで研究を行った。

1. *FUS*変異ALS症例を集積し遺伝子型-表現型関連を明らかにし、
2. 培養細胞条件下で病理像類似の異常凝集体が生じる条件を免疫細胞化学 (ICC) で検討する、
3. 健常者及び*FUS*変異FALS症例よりiPSCsを樹立し、ゲノム編集技術を用いて*FUS*変異の有無のみ異なるiPSCsを作成、運動ニューロンへ分化誘導し、表現型を検証する、
4. 新規デバイスで軸索と細胞体を分離し、RNAシーケンス (RNA-Seq) により網羅的に解析する。

【結果・考察】1. 常染色体優性遺伝形式を示す111のFALS家系を解析した。*FUS*変異は日本人で2番目に多いFALS原因遺伝子変異で、スクリーニングが重要と考えられた。*FUS*変異

FALS12家系の平均発症年齢は37.0歳、平均罹病期間は28.5ヶ月と若年発症・急速進行性であった。*FUS*変異における遺伝子型-表現型関連が明らかとなり、2. 細胞株へ正常もしくは変異*FUS*を過剰発現させICCで局在を確認した。正常*FUS*は核に存在したが、変異*FUS*は一部細胞質に異常局在した。変異*FUS*は薬剤によるストレス負荷で、ストレス顆粒(SGs)と共局在する顆粒状の染色像を呈し、既報の再現が得られた。ストレス除去後SGsは消失する一方、*FUS*顆粒は残存するという新たな細胞表現型を見出し、ヒト病理像に近似した細胞モデルが得られた。3. TALEN法によるゲノム編集により、*FUS*の変異の有無のみ異なるiPSCsを作成し、運動ニューロンへ分化させた上でストレス負荷を行った。*FUS*変異iPSCs由来運動ニューロンでのみ、*FUS*が細胞質へ異常局在し、SGsと共局在する顆粒状染色像を呈した。細胞株同様の*FUS*異常局在が再現され、既報の細胞株実験の応用が可能であると考えられた。ストレス除去後に、神経突起中に残存する*FUS*顆粒を認め、神経突起中の*FUS*の機能異常という病態仮説を支持する所見と考えられた。4. 新規デバイスを用い、正常及び*FUS*変異iPSCs由来運動ニューロンの軸索・細胞体からそれぞれRNAを回収した。RNA-Seqにより抽出した遺伝子をクラスター解析し、発現変動する遺伝子群を治療標的候補として抽出できた。

【結論】*FUS*変異FALSは高浸透率・早期発症・急速進行性の比較的均一な表現型をとり、ALSの病態解析対象として重要であることが確認された。生体の異常を反映する細胞質*FUS*異常凝集体という細胞表現型を再現し、細胞株実験及びiPSCsの有用性を確認した。新規デバイスを組み合わせた網羅的な解析により見出した治療標的候補に対して介入実験及び治療開発を進める。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 FUS 変異による筋萎縮性側索硬化症患者由来の人工多能性幹細胞を用いた軸索病態解明

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 神経内科学分野

学籍番号 B3MD5002 氏名 秋山 徹也

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は系統的な運動ニューロン障害を特徴とし、発症から数年で死に至る難治性疾患である。ALSの約10%に家族性ALS（FALS）が存在し、1993年の*SOD1*の発見以降20以上の遺伝子が同定されている。FALS原因遺伝子の一つである*FUS*はRNA結合能を持つ蛋白をコードし、RNA代謝異常とALS病態の関連が指摘されている。*FUS*は通常核に局在するが、神経細胞では細胞質にも局在し、軸索輸送や局所翻訳に関わるとされる。ALSでは細胞死に先行する軸索変性の報告があり、*FUS*変異ALS症例の剖検脳では*FUS*陽性の細胞質異常凝集体が確認されている。そこで、*FUS*変異ALSでは、*FUS*のRNA結合蛋白としての機能異常により運動ニューロンの軸索輸送、局所翻訳が障害され細胞機能不全が生じると病態仮説をたてた。ALSを含む神経変性疾患では生体からの病変採取は困難で細胞株を用いた研究が主体だったが、人工多能性幹細胞（iPSCs）の発見により患者由来神経の解析が可能となった。

本研究では*FUS*変異がALSという表現型へ与える影響を明らかにし、*in vitro*での適切な細胞モデルを確立し、ALSの軸索病態における*FUS*変異の影響を解析するため、以下のステップで研究を行った。

1. *FUS*変異ALS症例を集積し遺伝子型-表現型関連を明らかにし、
2. 培養細胞条件下で病理像類似の異常凝集体が生じる条件を免疫細胞化学（ICC）で検討する、
3. 健常者及び*FUS*変異FALS症例よりiPSCsを樹立し、ゲノム編集技術を用いて*FUS*変異の有無のみ異なるiPSCsを作成、運動ニューロンへ分化誘導し、表現型を検証する、
4. 新規デバイスで軸索と細胞体を分離し、RNAシーケンス（RNA-Seq）により網羅的に解析する。

その結果、1. 常染色体優性遺伝形式を示す111のFALS家系を解析した。*FUS*変異は日本人で2番目に多いFALS原因遺伝子変異で、スクリーニングが重要と考えられた。*FUS*変異FALS12家系の平均発症年齢は37.0歳、平均罹病期間は28.5ヶ月と若年発症・急速進行性であった。*FUS*変異における遺伝子型-表現型関連が明らかとなり、2. 細胞株へ正常もしくは変異*FUS*を過剰発現させICCで局在を確認した。正常*FUS*は核に存在したが、変異*FUS*は一部細胞質に異常局在した。変異*FUS*は薬剤によるストレス負荷で、ストレス顆粒（SGs）と共局在

する顆粒状の染色像を呈し、既報の再現が得られた。ストレス除去後SGsは消失する一方、FUS顆粒は残存するという新たな細胞表現型を見出し、ヒト病理像に近似した細胞モデルが得られた。3. TALEN法によるゲノム編集により、*FUS*の変異の有無のみ異なるiPSCsを作成し、運動ニューロンへ分化させた上でストレス負荷を行った。*FUS*変異iPSCs由来運動ニューロンでのみ、FUSが細胞質へ異常局在し、SGsと共局在する顆粒状染色像を呈した。細胞株同様のFUS異常局在が再現され、既報の細胞株実験の応用が可能であると考えられた。ストレス除去後に、神経突起中に残存するFUS顆粒を認め、神経突起中のFUSの機能異常という病態仮説を支持する所見と考えられた。4. 新規デバイスを用い、正常及び*FUS*変異iPSCs由来運動ニューロンの軸索・細胞体からそれぞれRNAを回収した。RNA-Seqにより抽出した遺伝子をクラスター解析し、発現変動する遺伝子群を治療標的候補として抽出できた。

*FUS*変異FALSは高浸透率・早期発症・急速進行性の比較的均一な表現型をとり、ALSの病態解析対象として重要であることが確認された。生体の異常を反映する細胞質FUS異常凝集体という細胞表現型を再現し、細胞株実験及びiPSCsの有用性を確認した。新規デバイスを組み合わせた網羅的な解析により見出した治療標的候補に対して介入実験及び治療開発を進める。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。